



FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

---

# **Ensaio de biocontaminação por microfungos em vários tipos de polímeros**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra  
para cumprimento dos requisitos à obtenção do  
grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia  
Vegetal, realizada sob a orientação científica do  
Professor Doutor António Manuel Santos Carriço  
Portugal (Universidade de Coimbra).

Ludgero Miguel Moreira Pratas Roovers de Avelar

---

Julho de 2012



## **Agradecimentos**

Para começar gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, ajudaram à realização desta dissertação.

Ao Prof. Doutor António Portugal, pelo apoio, confiança, disponibilidade, empenho, bom humor e orientação que me concedeu durante a realização deste trabalho.

Ao Instituto Pedro Nunes, pela pessoa da Cecília Lavrador, pela oportunidade criada para participação neste projecto.

Ao Grupo de Colóides do Departamento de Química da FCTUC, pela pessoa da Salomé Santos, pela oportunidade criada para participação neste projecto.

À Dona Eulália, funcionária do departamento, pela assistência na preparação dos meios de cultura.

Aos meus amigos por me aturarem e ajudarem a distrair nos meus tempos livres.

À Sandra Videira, por toda a ajuda, apoio e incentivos que me deu desde o primeiro momento.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Diana Paiva e João Trovão, pela ajuda, amizade e bom humor com que me presentearam todos os dias.

À Inês Balula, minha namorada, pelas correcções, apoio e paciência com que me ouviu falar sobre este trabalho.

Aos meus pais, pelo esforço que me permitiu aqui chegar e pelo apoio e confiança incondicionais que sempre recebi.



## Resumo

Actualmente a dependência de materiais poliméricos atingiu níveis em que é difícil não estar constantemente em contacto com eles. A indústria dos plásticos gera milhões em receitas e tende a crescer todos os anos. São diversos os materiais poliméricos produzidos, cada um com as suas características de interesse e adaptados a indústrias específicas. Nos últimos anos, os poliuretanos têm-se destacado pela superioridade apresentada em várias características e têm vindo a substituir muitos dos polímeros utilizados anteriormente. Os poliuretanos podem ser separados em dois grupos, os poliéster e os poliéter conforme o composto que foi utilizado na sua síntese. Os poliéster poliuretanos são susceptíveis a degradação por microrganismos enquanto que os poliéter apresentam resistência. Uma outra indústria com bastante impacto económico, é a dos revestimentos. Os custos associados com a corrosão e degradação de diversas superfícies representam 3% do produto interno bruto das nações mundiais. Os revestimentos são utilizados pela estética e como protecção. As tintas enquadram-se em ambas, podendo ser modificadas incorporando micropartículas de sílica como libertadores controlados de biocidas, aumentando o nível de protecção. Existem diversas espécies de microrganismos fúngicos capazes de degradar polímeros e cuja exposição constante pode potenciar graves problemas de saúde em humanos. É com o intuito de evitar situações destas que são publicadas normas de avaliação a que os produtos devem corresponder. Como tal realizaram-se ensaios de biocontaminação por microfungos em diversos produtos poliméricos novos para avaliar o seu nível de conformidade. Os resultados dos ensaios em poliéter poliuretano foram de encontro à bibliografia disponível mostrando-se resistentes aos ataques dos microfungos, enquanto que os ensaios com os revestimentos demonstraram a falta de eficácia de algumas formulações e o potencial de outras para a protecção contra a degradação fúngica.

**Palavras-chave:** biocidas; biocontaminação; microfungos; micropartículas de sílica; poliuretano.



## **Abstract**

The dependance on polymeric materials has reached levels were it's hard not to be in permanent contact with them. The plastics industry generates millions in profits and continues to grow every year. There are several polymeric materials produced, each with its own prevalent characteristics and adapted to a specific industry. In the last few years, polyurethanes have stood out for their superiority in various characteristics and are replacing many of the polymers used before them. Polyurethanes can be divided into two groups, polyester and polyether, according to the compound utilized during its synthesis. Polyester polyurethanes are susceptible to degradation by microorganisms, while polyether is resistant. One other industry with a large economic impact, is the coatings industry. Costs associated with corrosion and degradation of various surfaces represent 3% of the gross domestic product of the world nations. Coatings are used for their aesthetics and for protection. Paints fit into both, allowing to be modified by incorporating silica microparticles as controlled biocide dispersers, increasing the level of protection. There are several species of fungal microorganisms capable of degrading polymers to which constant exposure can lead to serious health problems in humans. It is with the goal of trying to prevent these situations that standards get published to which the products should be accessed. As such, microfungi biocontamination essays were performed on a variety of new polymeric products to test their compliance. The results of the polyether polyurethane essays were according to the bibliography available, showing resistance to microfungi attack, while the coating essays showed a lack of efficiency of some of the formulations and the potential of others for protection against fungal degradation.

**Keywords:** biocides; biocontamination; microfungi; polyurethane; silica microparticles.





## Índice

1 - Introdução.....	21
1.1 - Polímeros.....	21
1.1.1 - Impacto económico.....	21
1.1.2 - Aplicações.....	22
1.1.3 - Poliuretanos .....	22
1.2 - Revestimentos.....	23
1.2.1 - Impacto económico.....	23
1.2.2 - Aplicações.....	24
1.2.3 - Micropartículas .....	24
1.2.4 - Biocidas .....	24
1.3 - Degradação .....	26
1.3.1 - Degradação abiótica.....	27
1.3.2 - Degradação biótica .....	27
1.4 - Microrganismos fúngicos .....	28
1.4.1 - <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.....	28
1.4.2 - <i>Aspergillus</i> .....	30
1.4.2.1 - <i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) G. Winter.....	31
1.4.2.2 - <i>Aspergillus niger</i> Tiegh.....	32
1.4.3 - <i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.....	33
1.4.4 - <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries .....	34
1.5 - Normas .....	35
1.6 - Objectivos.....	35
2 - Materiais e Métodos .....	39
2.1 - Material biológico .....	39
2.2 - Material não biológico.....	39
2.3 - Metodologia.....	40



2.3.1 - Preparação do meio de cultura.....	40
2.3.2 - Extracção de esporos .....	41
2.3.3 - Lavagem de esporos.....	41
2.3.4 - Contagem de esporos .....	41
2.3.5 - Preparação do material de teste .....	42
2.3.6 - Inoculação .....	43
2.3.7 - Incubação .....	43
3 - Resultados .....	47
3.1 - Poliuretano com madeira.....	47
3.2 - Poliuretano com <i>waste</i> .....	49
3.3 - Revestimento .....	51
4 - Discussão.....	57
5 - Conclusão e Perspectivas .....	61
6 - Referências Bibliográficas .....	65
6.1 - Artigos e Livros.....	65
6.2 - Referências online .....	69
6.3 - Referências online de imagens .....	70



## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Consumo mundial de polímeros sintéticos (milhares de toneladas) (Adaptado de Biron 2007). .....	21
<b>Figura 2</b> - Processo de formação de PU (Adaptado de Nakajima-Kambe <i>et al.</i> 1999). 23	
<b>Figura 3</b> - Estrutura da 8-hidroxiquinolina [14]. .....	25
<b>Figura 4</b> - Estrutura do IPBC [15]. .....	26
<b>Figura 5</b> - Estrutura do LM 200.....	26
<b>Figura 6</b> - Colónia de <i>Alternaria alternata</i> em PDA [16]. .....	29
<b>Figura 7</b> - Colónias de <i>Aspergillus nidulans</i> em PDA. ....	31
<b>Figura 8</b> - Colónia de <i>Aspergillus niger</i> em PDA. ....	32
<b>Figura 9</b> - Colónias de <i>Chaetomium globosum</i> em PDA. ....	33
<b>Figura 10</b> - Colónias de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em PDA. ....	34
<b>Figura 11</b> - Os diferentes PE-PU's utilizados, <b>A)</b> PU sem <i>skin</i> ; <b>B)</b> PU sem <i>skin</i> com madeira; <b>C)</b> PU sem <i>skin</i> com <i>waste</i> ; <b>D)</b> PU com <i>skin</i> ; <b>E)</b> PU com <i>skin</i> com madeira; <b>F)</b> PU com <i>skin</i> com <i>waste</i> . .....	39
<b>Figura 12</b> - Hemocitómetro utilizado para a contagem de esporos. ....	42
<b>Figura 13</b> - Estufa com material inoculado. ....	43
<b>Figura 14</b> - Crescimento de <i>Aspergillus niger</i> em PU sem <i>skin</i> (Lupa 50x). .....	47
<b>Figura 15</b> - Espátula médica dos ensaios do PU com madeira inoculada com <i>Aspergillus niger</i> . ....	49
<b>Figura 16</b> - Discos de papel com micropartículas de sílica (Zhao <i>et al.</i> 1998) e IPBC adicionado depois da calcinação, inoculados com <i>Alternaria alternata</i> e <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <b>A)</b> réplica 1; <b>B)</b> réplica 3; <b>C)</b> réplica 2. ....	52



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Exemplos de usos de polímeros sintéticos (Adaptado de Shah <i>et al.</i> 2008). 22	
<b>Tabela 2</b> - Mecanismos propostos de resistência fúngica a antissépticos e desinfetantes (McDonnell <i>et al.</i> 1999). .... 25	
<b>Tabela 3</b> - Materiais de revestimento utilizados nos ensaios e os seus respectivos componentes. .... 40	
<b>Tabela 4</b> - Componentes utilizados na preparação do meio de cultura PDA. .... 41	
<b>Tabela 5</b> – Composição dos conjuntos de teste utilizados para a realização dos diversos ensaios. .... 43	
<b>Tabela 6</b> - Classificação do crescimento observado nos materiais (Adaptado de ASTM 1996). .... 44	
<b>Tabela 7</b> - Resultados do PU com madeira inoculado com <i>Aspergillus nidulans</i> . .... 48	
<b>Tabela 8</b> - Resultados do PU com madeira inoculado com <i>Aspergillus niger</i> . .... 48	
<b>Tabela 9</b> - Resultados do PU com madeira inoculado com <i>Chaetomium globosum</i> . .... 48	
<b>Tabela 10</b> - Resultados do PU com madeira inoculado com <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Chaetomium globosum</i> . .... 49	
<b>Tabela 11</b> - Resultados do PU com <i>waste</i> inoculado com <i>Aspergillus nidulans</i> . .... 50	
<b>Tabela 12</b> - Resultados do PU com <i>waste</i> inoculado com <i>Aspergillus niger</i> . .... 50	
<b>Tabela 13</b> - Resultados do PU com <i>waste</i> inoculado com <i>Chaetomium globosum</i> . .... 51	
<b>Tabela 14</b> - Resultados do PU com <i>waste</i> inoculado com <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Chaetomium globosum</i> . .... 51	
<b>Tabela 15</b> - Resultados do revestimento inoculado com <i>Alternaria alternata</i> e <i>Cladosporium cladosporioides</i> , respeitantes à superfície total da caixa de Petri. .... 52	
<b>Tabela 16</b> - Resultados ajustados do revestimento, considerando apenas a superfície do papel, inoculado com <i>Alternaria alternata</i> e <i>Cladosporium cladosporioides</i> . (NA – Não Aplicável). .... 53	





### **Lista de abreviaturas**

ASTM - American Society for Testing and Materials

atm - atmosfera

CFE - Centre for Functional Ecology (Centro de Ecologia Funcional UC)

cm - centímetro

FCTUC - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

g - gramas

IPBC - 3-iodopropynyl N-butylcarbamate

IPN - Instituto Pedro Nunes

ISO - International Organization for Standardization

L - Litro

LM 200 - N,N-dimethyl-N-Dodecylammonium

mg - miligramas

ml - mililitro

mm - milímetros

PDA - Potato Dextrose Agar

PE-PU - poliéter poliuretano

PS-PU - poliéster poliuretano

PU - poliuretano

rpm - rotações por minuto

UV - ultra violeta

VdL - Verband der Lackindustrie e.V.

°C - graus Celcius

[#] - Referência bibliográfica online



## **Capítulo I – Introdução**



## 1 - Introdução

Este trabalho incide sobre a análise e avaliação de vários polímeros e revestimentos no que diz respeito à contaminação fúngica. Materiais desenvolvidos pelo IPN e pelo Grupo de Colóides do Departamento de Química da FCTUC foram fornecidos ao CFE para serem testados quanto à sua resistência à biocontaminação.

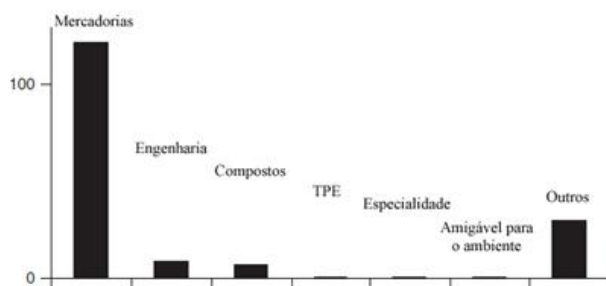
### 1.1 - Polímeros

Os polímeros são macromoléculas, de fabrico humano ou de origem natural, compostos por pequenas unidades estruturais, monómeros, repetidas várias vezes (Scott 1999). De entre todos os polímeros existentes, os plásticos são os mais conhecidos do público. O seu nome deriva da palavra grega “*plastikos*”, que significa algo que pode ser moldado em diferentes formas (Shah *et al.* 2008). Estes são geralmente classificados em dois grupos, os termofixos e os termoplásticos (Singh *et al.* 2008). Termoplásticos são formados por cadeias longas não ramificadas e podem voltar a ser moldados, os termofixos apresentam cadeias ramificadas e uma vez moldados não é possível mudar a sua forma [13].

É possível criar polímeros com diversas características, dependendo dos seus elementos (Scott 1999) e essa diversidade tem criado um aumento da procura e da utilização de materiais poliméricos (Shah *et al.* 2008).

#### 1.1.1 - Impacto económico

A indústria dos polímeros é de larga escala e de elevada importância económica. Calculam-se que sejam produzidos mais de 140 milhares de toneladas de polímeros sintéticos por ano (Figura 1), com um lucro estimado na ordem dos 560 milhares de milhões de dólares americanos e apresenta um crescimento anual médio na ordem dos 4% (Shimao 2001; Biron 2007).



**Figura 1** - Consumo mundial de polímeros sintéticos (milhares de toneladas) (Adaptado de Biron 2007).

### 1.1.2 - Aplicações

A larga variedade de utilizações dada aos polímeros deve-se à diversidade da sua produção actual (Tabela 1), sendo cada um produzido com diferentes propriedades mecânicas, ópticas e eléctricas (Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008), tornando-os ideais para a área em que são requisitados (Shah *et al.* 2008). Dos polímeros produzidos e utilizados actualmente, os mais figurados nos vários aspectos da vida moderna são os poliuretanos. Estes representam uma classe com diversos usos numa larga gama de indústrias, com grande impacto no dia-a-dia (Howard 2002). No entanto a constante exposição a polímeros sintéticos pode acarretar riscos derivados de possíveis contaminações (Ilyin 2005; Savelyev *et al.* 2009).

**Tabela 1** - Exemplos de usos de polímeros sintéticos (Adaptado de Shah *et al.* 2008).

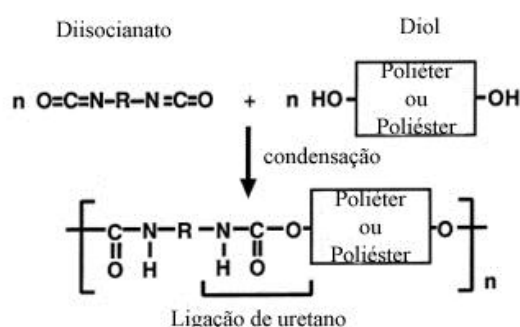
Polímeros	Usos
Polietileno	Sacos plásticos, garrafas, brinquedos, tubagens
Poliestireno	Copos descartáveis, material de laboratório
Poliuretano	Pneus, isolamentos, esponjas, coletes salva-vidas
Cloreto de polivinila	Cortinas de chuveiro, gabardines, solas de sapatos
Polipropileno	Palhinhas, seringas, tampas, baterias de automóveis
Tereftalano de polietileno	Enchimento de sacos-cama, fibras têxteis
Náilon	Capacetes, tintas, tecidos, celofane
Policarbonato	Lentes de óculos, telhados de estufas
Politetrafluoroetileno	Utensílios de cozinha não aderentes

### 1.1.3 - Poliuretanos

Os PUs estão a substituir diversos polímeros por variadas razões (Howard 2002; Shah *et al.* 2008), tais como a ausência de compostos voláteis, menor densidade, maior flexibilidade e durabilidade, entre outras características. Estas vantagens funcionais derivam dos materiais envolvidos na produção do polímero, tendo garantido um uso predominante nos campos da indústria médica, indústria automóvel e produção industrial (Howard 2002).

Esta classe de polímero sintético apresenta ligações intramoleculares de uretano, cuja formação é fruto de uma reacção de condensação que envolve vários materiais (Figura 2), diisocianatos, diois, catalisadores e materiais auxiliares (Nakajima-Kambe *et al.* 1999; Shah *et al.* 2008). Dos materiais utilizados para a formação do PU, são os

dois que vão determinar o seu tipo, podendo ser um PS-PU se for utilizado um poliéster, ou PE-PU no caso de se partir de um poliéter (Figura 2). Estes dois tipos de PU apresentam uma susceptibilidade diferente ao ataque por microrganismos. O PE-PU é mais resistente do que o PS-PU. Isso deve-se a diferenças na sua estrutura molecular. Já foi observado que só ocorre o ataque por microrganismos se existir uma cadeia de carbono suficientemente longa, sem ramificações entre as ligações de uretano (Darby *et al.* 1968). Postula-se ainda que a estrutura do PE-PU dificulta o acesso de enzimas às ligações de éster, não permitindo assim a clivagem dessas e subsequente degradação (Nakajima-Kambe *et al.* 1999; Shah *et al.* 2008).



**Figura 2** - Processo de formação de PU (Adaptado de Nakajima-Kambe *et al.* 1999).

O foco deste estudo é em dois materiais de isolamento novos de PE-PU desenvolvidos pelo IPN. Um deles utiliza desperdícios (*waste*) da construção civil como material auxiliar para a estabilização do composto e o outro recicla madeira como material auxiliar.

## 1.2 - Revestimentos

Revestimentos são materiais utilizados como forma de protecção em determinadas superfícies. Têm como função evitar a corrosão, degradação e outros tipos de danos que possam ser infligidos sobre a superfície, ou são utilizados como forma de melhorar algumas características como a aderência, entre outras [10]. Estes podem ser aplicados sob a forma de líquidos, gases ou sólidos através de uma grande variedade de processos, conforme o estado em que o revestimento será aplicado [10].

### 1.2.1 - Impacto económico

Todos os anos os custos associados com a corrosão e degradação são na ordem dos €1.3 biliões ou cerca de 3% do produto doméstico bruto das nações mundiais [7]. Este valor está associado a reparações e substituições de materiais corroídos ou degradados e

poderia diminuir com ajuda de várias acções, incluindo o desenvolvimento de revestimentos mais eficientes [7].

### **1.2.2 - Aplicações**

Existe uma larga variedade de aplicações para os revestimentos. Estes podem incluir espelhos, cromados, polímeros como o teflon, revestimentos de facas, vernizes e tintas [10]. Alguns revestimentos são utilizados para protecção como os vernizes e tintas, outros pela sua utilidade como é o caso dos espelhos e do teflon, ou são utilizados principalmente de um ponto de visto estético como os cromados. No entanto existe ainda espaço na indústria para o desenvolvimento de novas aplicações, como é o caso da integração de micropartículas para a dispersão controlada de biocidas em tintas (Zhao *et al.* 1998; Sørensen *et al.* 2010).

### **1.2.3 - Micropartículas**

As micropartículas de sílica apresentam um pequeno poro no qual são capazes de reter uma substância, libertando-a de forma controlada ao longo do tempo (Zhao *et al.* 1998; Sørensen *et al.* 2010). Combinadas com substâncias biocidas e integradas em tintas podem ser utilizadas como forma de controlar algumas das causas da corrosão e degradação biológica.

Estas micropartículas formuladas de acordo com Zhao *et al.* (1998) e umas baseadas no mesmo protocolo, mas com uma formulação diferente (Santos *et al.* 2011), são um dos focos deste estudo.

### **1.2.4 - Biocidas**

Os biocidas são agentes químicos, com um largo espectro de acção, capazes de afectar negativamente microrganismos. São utilizados em antissépticos e desinfectantes como forma de prevenção de contaminações e infecções, mas apesar da sua extensa utilização, não existe muita informação sobre os mecanismos de acção dos vários tipos de biocidas. É provável que exista uma sequência de eventos em comum para os diferentes microrganismos, em que o agente interage com a superfície da célula, penetra na membrana celular e por fim afecta um local de acção específico (McDonnell *et al.* 1999). A capacidade de acção dos biocidas está, no entanto, dependente de vários factores, tais como o ambiente físico externo, a natureza, estrutura e condições do organismo e finalmente a capacidade do organismo em degradar ou inactivar a substância (Russell 2004).



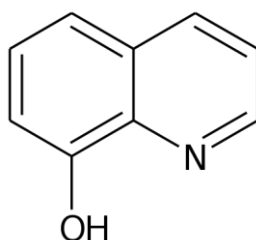
No que toca aos mecanismos de resistência fúngica aos biocidas, existem poucos dados concretos sobre as suas formas de acção, estando a informação conhecida até à data restringida a um pequeno grupo de biocidas, tais como, por exemplo, o gluconato de clorexidina e o formaldeído (McDonnell *et al.* 1999; Maillard 2004), sendo que estes são dos biocidas de uso mais comum. São reconhecidos dois tipos de resistência, intrínseca e adquirida, com uma variedade de mecanismos propostos (Tabela 2). No entanto, alguns destes mecanismos não foram demonstrados até hoje (McDonnell *et al.* 1999; Maillard 2004).

**Tabela 2** - Mecanismos propostos de resistência fúngica a antissépticos e desinfectantes (McDonnell *et al.* 1999).

Tipo de resistência	Mecanismo proposto	Exemplo
<b>Intrínseca</b>	Exclusão	Gluconato de clorexidina
	Inactivação enzimática	Formaldeído
	Modulação fenotípica	Etanol
	Efluxo	Não demonstrado
<b>Adquirida</b>	Mutação	Alguns conservantes
	Efluxo induzível	Alguns conservantes
	Resposta mediada por plasmídeos	Não demonstrado

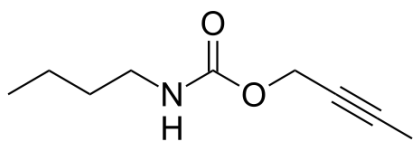
Das várias substâncias utilizadas actualmente como biocidas, este estudo foca-se apenas em três, 8-hidroxiquinolina, IPBC e LM 200.

A 8-hidroxiquinolina (Figura 3) é um composto orgânico derivado da quinolina através da adição de um grupo OH ao carbono 8 [8]. Sabe-se que este composto possui propriedades antissépticas e desinfectantes, actuando como biocida em bactérias e fungos (Phillips 1956; Moore *et al.* 2004).



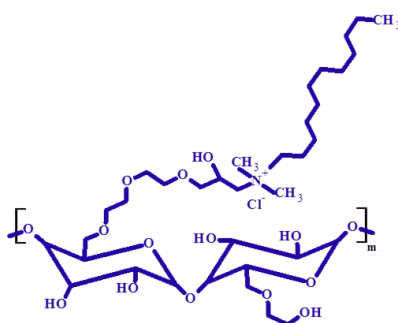
**Figura 3** - Estrutura da 8-hidroxiquinolina [14].

IPBC (Figura 4) é um biocida membro da família dos carbamatos [1] cujo mecanismo de acção nos microrganismos não é conhecido. Julga-se que este pode estar relacionado com a acção do iodo presente no composto, que é igualmente reconhecido como tendo um efeito biocida (McDonnell *et al.* 1999; Moore *et al.* 2004).



**Figura 4** - Estrutura do IPBC [15].

Por fim considera-se o LM 200 (Figura 5), um polímero com características fungicidas. Park *et al.* (2006) observaram que polímeros carregados positivamente com grupos hidrofóbicos ligados à sua cadeia principal podem ter funções de fungicida, pois a carga juntamente com a penetração destes grupos nas membranas celulares dos fungos destrói as células.



**Figura 5** - Estrutura do LM 200.

### 1.3 - Degradação

O processo de degradação de polímeros é definido como qualquer alteração física ou química como resultado de factores ambientais ou de actividade biológica (Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008). Estas são alterações que causam variações nas propriedades mecânicas, ópticas e eléctricas dos materiais através da fragmentação, quebra de ligações moleculares, erosão, descoloração e separação de fases (Zee 2005; Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008).

Existem factores que podem afectar os mecanismos de degradação (Chandra *et al.* 1998; Singh *et al.* 2008; Tokiwa *et al.* 2009; Mohan *et al.* 2010), tais como a estrutura e morfologia dos polímeros, composição química, peso molecular, tamanho das moléculas, propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, aditivos e, claro, as condições ambientais.

A degradação pode ser causada por diferentes factores como a acção enzimática (Chandra *et al.* 1998; Nakajima-Kambe *et al.* 1999; Zee 2005; Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008; Mohan *et al.* 2010; Loredó-Treviño *et al.* 2012), hidrólise química, oxidação, stress mecânico, solubilização, ionização (Singh *et al.* 2008) e a temperatura

(Zee 2005; Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008). Os factores de degradação, em geral, podem ser divididos em duas categorias – factores abióticos que não dependem de seres vivos mas sim do ecossistema, e factores bióticos que são dependentes de seres vivos.

### **1.3.1 - Degradação abiótica**

Dos vários factores de degradação abiótica possíveis, os mais importantes são a degradação térmica, a fotodegradação e a degradação por stress mecânico (Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008).

A degradação por stress mecânico acontece quando o material é exposto a forças excessivas ou repetitivas durante grandes períodos de tempo, podendo levar a quebras das cadeias poliméricas e do material (Singh *et al.* 2008).

Os mecanismos de fotodegradação e de degradação térmica são semelhantes, envolvendo apenas estímulos diferentes (Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008). A degradação térmica ocorre quando o material é constantemente exposto a temperaturas elevadas ao passo que a fotodegradação é provocada pela exposição a radiações, como a radiação UV. O que ocorre após a exposição é uma excitação dos átomos que vai potenciar a quebra das ligações originais e a formação de novas, alterando assim a estrutura e características originais (Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008).

### **1.3.2 - Degradação biótica**

No que toca à degradação biótica, o elemento mais importante é a degradação induzida por microrganismos, estando documentada por vários autores a importância de várias espécies de bactérias e fungos neste processo (Chandra *et al.* 1998; Klintworth *et al.* 1999; Nakajima-Kambe *et al.* 1999; Howard 2002; Gu 2007; Shah *et al.* 2008). É através de dois mecanismos que os microrganismos afectam os polímeros e promovem a sua degradação. Com o crescimento, os microrganismos podem penetrar nos materiais e causar quebras e fendas que alteram a estrutura e propriedades do polímero (Shah *et al.* 2008). O outro mecanismo é através da acção enzimática (Nakajima-Kambe *et al.* 1999; Shah *et al.* 2008; Savelyev *et al.* 2009; Mohan *et al.* 2010) em que o microrganismo utiliza enzimas que degradam as ligações químicas do material de forma a obter compostos de carbono (Gu 2003). As enzimas envolvidas na degradação são esterases, proteases ou ureases (Nakajima-Kambe *et al.* 1999) com acção extra ou intracelular (Gu 2003), sendo que as extracelulares decompõem as cadeias poliméricas em pedaços mais pequenos que possam ser absorvidos e as intracelulares decompõem-

nos para formas que o microrganismo consiga utilizar (Gu 2003; Shah *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008). Algumas das enzimas utilizadas na degradação já foram sequenciadas (Nakajima-Kambe *et al.* 1999; Shah *et al.* 2008).

No contexto deste ensaio os microrganismos de interesse serão os microfungos.

#### **1.4 - Microrganismos fúngicos**

No presente estudo foram escolhidas espécies fúngicas com base na sua acessibilidade e potencial impacto na saúde pública de entre um grupo de organismos recomendados (ASTM 1996; ISO 1997; VdL 1998; ASTM 2000).

Hyvärinen *et al.* (2002) observaram a presença de indivíduos, da quase totalidade dos géneros escolhidos, em papeis, tintas e plásticos, entre outros, utilizados na construção, que apresentavam sinais de degradação. Por outro lado, ensaios feitos sobre a degradação fúngica de materiais poliméricos (Lugauskas *et al.* 2003) demonstravam contaminações, pelas espécies de interesse, numa grande maioria dos materiais testados. Ainda num estudo sobre a degradação de PS-PU por comunidades fúngicas do solo, Cosgrove *et al.* (2007) registaram a presença de um dos géneros nos materiais em causa.

Todas as espécies escolhidas são Ascomycota. Este filo inclui um número de espécies importantes economicamente. Vários dos bolores que causam estragos na comida e outras espécies que provocam uma variedade de doenças graves em plantas pertencem a este filo (Raven *et al.* 1999). Outras espécies de importância, tais como as trufas, também integram este filo.

Um factor a ter em conta é que a exposição a certos fungos pode causar doenças e infecções em humanos. Estas ocorrem através de mecanismos específicos, tais como a promoção de uma resposta imunológica prejudicial, infecção pelo microrganismo e pelos efeitos nefastos causados pelos produtos tóxicos dos fungos. Estes mecanismos estão associados a algumas doenças bastante conhecidas como a asma, a sinusite e as aspergiloses (Bush *et al.* 2006).

##### **1.4.1 - *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.**

As espécies de *Alternaria* são maioritariamente saprófitas em que várias delas são patógenos de plantas que causam uma variedade de doenças importantes economicamente (Thomma 2003), tais como manchas e podridão das folhas, numa grande variedade de plantas de elevada importância agronómica, como o tomate, trigo,

cevada, arroz entre outros (Pitt *et al.* 2009). Mais de 100 espécies já foram descritas, sendo encontradas comumente no solo ou em tecidos vegetais em decomposição (Thomma 2003).

Das espécies de *Alternaria* existentes, *Alternaria alternata*, uma espécie saprófita (de Hoog *et al.* 2000) com capacidade para decompor celulose [4], é a mais abundante sendo detectada em vários substratos, como plantas, alimentos e têxteis (Domsch *et al.* 2007; Pitt *et al.* 2009) e frequentemente encontrada em florestas e solos cultivados.

O crescimento óptimo de *A. alternata* foi registado entre os 22 e os 30 °C (Domsch *et al.* 2007) [4], com uma temperatura ideal de 25 °C (Pitt *et al.* 2009), mínima entre os 2,5 e os 6,5 °C (Pitt *et al.* 2009) [4] e máxima de 32 °C [4], não sendo registado qualquer crescimento a partir dos 36 °C (Pitt *et al.* 2009) [4]. Quanto ao pH, foi observado crescimento entre os 2,7 e os 8,6 (Domsch *et al.* 2007; Pitt *et al.* 2009) [4] com o valor óptimo entre 4 e 5,4 (Pitt *et al.* 2009) [4]. Simmons (2007) indica que o ritmo de crescimento radial para as colónias de *A. alternata* é de 5 mm por dia em condições padrão, com estas a apresentarem cores do cinzento ao verde azeitona (Figura 6) com uma textura semelhante ao feltro (de Hoog *et al.* 2000). A esporulação ocorre melhor no escuro, quando comparado com a exposição total a luz branca, com temperaturas óptimas entre 25 e 27 °C, mínima de 15 °C e máxima de 33 °C [4].



**Figura 6** - Colónia de *Alternaria alternata* em PDA [16].

É conhecido que esta espécie produz uma variedade de toxinas entre as quais o ácido tenuazónico [4] que é tóxico para uma grande variedade de plantas e animais em particular ratos, galinhas e seus embriões (Pitt *et al.* 2009). Foi também reportada a produção de tentoxina por Thomma (2003), capaz de causar clorose em várias

dicotiledóneas [4]. Outra toxina responsável por clorose e com actividade antifúngica produzida por *A. alternata* é o alternariol (Pitt *et al.* 2009) [4]. São ainda produzidas outras toxinas com menores níveis de toxicidade como as altertoxinas I, II e III mas que possuem capacidades mutagénicas (Pitt *et al.* 2009).

A toxicidade de *A. alternata* afecta também os seres humanos, sendo que os esporos desta espécie são dos alergénicos mais comuns (Thomma 2003). Outros casos, alguns mais graves, foram já reportados, com ocorrências de lesões na pele em pacientes imunodeprimidos, queratites, endoftalmites, onicomicoses (de Hoog *et al.* 2000) e leucopenias [4]. Níveis elevados de ácido tenuazónico estão associados com uma forma de trombocitopenia (Pitt *et al.* 2009).

#### **1.4.2 - *Aspergillus***

*Aspergillus* é um género de bolores apenas com reprodução assexual. As suas espécies estão entre as mais comuns e disseminadas, representando um papel importante nos ecossistemas e na economia (Bennett 2012). As espécies deste género são saprófitas (Bennett 2012) que podem ser encontradas numa grande variedade de substratos. Entre estes, o solo, vegetação em decomposição, papel, têxteis, alimentos e tecidos humanos são locais de onde podem ser comumente isolados (Pitt *et al.* 2009; Bennett 2012). A sua capacidade de crescer em condições de altas temperaturas e com pouca disponibilidade de água permite-lhes abranger um largo espectro de habitats, contribuindo também para isso a maior resistência dos seus esporos, quando comparados com outras espécies, ao efeito da luz e de diversos químicos (Pitt *et al.* 2009).

Bennett (2012) reporta que certas espécies de *Aspergillus* actuam como patógenos de plantas ou animais podendo causar doenças pela indução de respostas alérgicas, produção de micotoxinas ou através de infecções localizadas ou sistémicas. As reacções alérgicas são causadas pela exposição aos esporos de *Aspergillus* no ar ou através de comida ingerida, sendo complicado evitar exposição dada a grande disseminação dos esporos deste género. No entanto para que haja proliferação de infecções em humanos, é quase um pré-requisito que o hospedeiro esteja num estado de imunodepressão. Exposição a toxinas de *Aspergillus* acontece pelo consumo de alimentos que tenham sido contaminados, sendo as toxinas de interesse a aflatoxina, reportada como cancerígena [9], a ocratoxina, possivelmente cancerígena e com actividade mutagénica [12], a patulina e a *fumagillin* que apresenta capacidades biocidas [11].

Chama-se aspergilose a todas as formas de doença animal causadas por uma espécie de *Aspergillus* num hospedeiro vivo. Estas incluem formas graves de asma, aspergiloma e infecções sistémicas e localizadas. As formas invasivas de aspergilose apresentam graus elevados de mortalidade (Bennett 2012).

São ainda de elevada importância económica devido à sua utilização em processos industriais na produção de ácidos, amílases e alguns produtos alimentícios (Bennett 2012).

#### 1.4.2.1 - *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter

Esta espécie (Figura 7) apresenta colónias de crescimento rápido, 5 a 6 cm de diâmetro em 2 semanas, com cor entre o verde e o amarelo mel, e o inverso em tons de roxo (Raper *et al.* 1965; de Hoog *et al.* 2000). Foi reportado como agente em diversas infecções em humanos e animais tais como infecções pulmonares e cerebrais, sinusite, endoftalmite, osteomielite e infecções superficiais (de Hoog *et al.* 2000).



**Figura 7** - Colónias de *Aspergillus nidulans* em PDA.

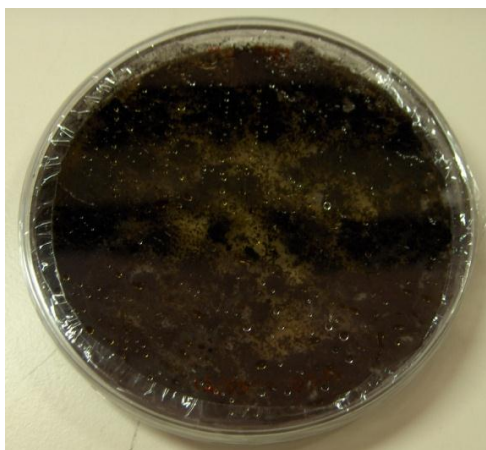
Esta espécie apresenta ainda um teleomorfo (Raper *et al.* 1965; Kozakiewicz 1995; de Hoog *et al.* 2000; Pitt *et al.* 2009), a *Emericella nidulans* (Eidam) Vuill., embora o estado anamorfo seja o dominante (Kozakiewicz 1995). *E. nidulans* tem uma distribuição mundial habitando predominantemente no solo, mas sendo por vezes observada em vegetação em decomposição e em diversos tipos de cereais (Onions 1966b; Kozakiewicz 1995; Samson *et al.* 2004; Pitt *et al.* 2009) [6]. As colónias de *E. nidulans* apresentam uma coloração entre o verde claro e o verde escuro, verificando-se crescimento com uma temperatura mínima entre os 6 e 8 °C, máxima dos 48 aos 51 °C, sendo a temperatura ideal dos 35 aos 37 °C (Pitt *et al.* 2009). Foi reportada, por vários

autores (Onions 1966b; Kozakiewicz 1995; Samson *et al.* 2004), como patogénica em humanos e animais causando aspergilose, onicomicose e infecções superficiais. Quanto às toxinas, está documentada a produção de penicilina e *nidulotoxin* (Samson *et al.* 2004), *emestrin* (Pitt *et al.* 2009) e *sterigmatocystin* (Samson *et al.* 2004; Pitt *et al.* 2009) que é um precursor da aflatoxina [6].

#### 1.4.2.2 - *Aspergillus niger* Tiegh.

Uma das espécies mais conhecidas do género *Aspergillus*, com uma distribuição mundial, é a espécie *A. niger* (Onions 1966a; Domsch *et al.* 2007; Pitt *et al.* 2009). Os esporos são disseminados pelo ar e podem ser isolados em diversos tipos de habitats e produtos, desde frutas, plantas, tecidos animais, sementes, cereais, carnes, matéria orgânica em decomposição entre outros (Onions 1966a; Domsch *et al.* 2007; Pitt *et al.* 2009).

As colónias de *A. niger* (Figura 8) apresentam cor preta cobrindo, geralmente, toda a caixa de Petri (Raper *et al.* 1965; de Hoog *et al.* 2000; Watanabe 2002; Domsch *et al.* 2007; Pitt *et al.* 2009). É possível observar crescimento desde os 6 a 8 °C aos 45 a 47 °C, com a temperatura ideal dos 35 aos 37 °C (Pitt *et al.* 2009), sendo capaz de sobreviver a 60 °C *in vitro* e verificando-se morte celular quando exposto a temperaturas de 63 °C a 65 °C por períodos superiores a 25 minutos [5]. Foi, no entanto reportado por Domsch *et al.* (2007) que o seu crescimento é inibido por *Chaetomium globosum*.



**Figura 8** - Colónia de *Aspergillus niger* em PDA.

É um patógeno reportado de plantas e animais (Onions 1966a; de Hoog *et al.* 2000; Pitt *et al.* 2009) [5], tendo sido, por exemplo, isolado do ouvido humano como agente de otomicose (Onions 1966a; de Hoog *et al.* 2000) [5], podendo ainda causar doenças

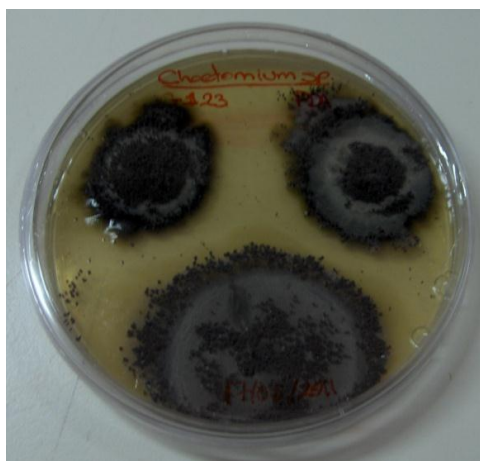


do sistema pulmonar, micetoma do pé, infecções oculares e da pélvis renal (Onions 1966a), aspergilose, endoftalmite, aspergiloma pulmonar, peritonite, endocardite, onicomicoses e infecções cutâneas (de Hoog *et al.* 2000). Já foi também reportada toxicidade em porcos e embriões de galinhas, morte em ratos e convulsões musculares e paralisia em coelhos [5]. Em plantas é responsável por decomposição de diversas frutas e vegetais (Pitt *et al.* 2009) e ainda por causar diversas doenças como a podridão do caule e raízes (Onions 1966a).

Quanto a metabolitos, *A. niger* produz ocratoxina A (Nielsen 2003; Pitt *et al.* 2009), *fumonisin B<sub>2</sub>* (Pitt *et al.* 2009) e a sua patogenicidade de plantas está associada com a produção de ácido oxálico (Onions 1966a). É ainda utilizado industrialmente para a produção de ácido glucónico e cítrico (Bennett 2012), e é capaz de metabolizar diversos fungicidas e herbicidas [5].

#### 1.4.3 - *Chaetomium globosum* Kunze ex Fr.

As espécies de *Chaetomium* são conhecidas por serem produtoras de celulasas, sendo regularmente encontradas em produtos de madeira ou papel e com alguma frequência em alguns tipos de comida (Pitt *et al.* 2009), muitas vezes após danos causados por água (Samson *et al.* 2004). Deste género, *Chaetomium globosum* é a espécie mais comum e por vezes descrita como a mais representativa (Nielsen 2003; Pitt *et al.* 2009).



**Figura 9** - Colónias de *Chaetomium globosum* em PDA.

As colónias de *C. globosum* (Figura 9) crescem rapidamente a 25 °C (Pitt *et al.* 2009) cobrindo a caixa de Petri (de Hoog *et al.* 2000; Samson *et al.* 2004; Pitt *et al.* 2009), estas apresentam uma coloração verde azeitona a verde escuro com o inverso de um castanho amarelado (Matsushima 1975; de Hoog *et al.* 2000; Samson *et al.* 2004). A

temperatura de crescimento óptima é entre os 24 e os 38 °C, não apresentando qualquer crescimento a temperaturas até 5 °C (Pitt *et al.* 2009) ou superiores a 42 °C (de Hoog *et al.* 2000). *C. globosum* tem uma distribuição mundial estando presente no solo, restos vegetais, papeis de parede, têxteis (Samson *et al.* 2004) e alguns cereais como o trigo e a cevada (Pitt *et al.* 2009).

Foi reportado (de Hoog *et al.* 2000) como agente causal de onicomicoses, lesões cutâneas, contaminações de fluídos de diálise, peritonites e efusões pleurais. É ainda capaz de produzir *chaetoglobsins* A e C que são compostos moderadamente tóxicos (Pitt *et al.* 2009) e *chaetomin* (Nielsen 2003).

#### 1.4.4 - *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries

As espécies do género *Cladosporium* são um resultado comum de isolamentos e costumam dominar os estudos de microflora dispersada pelo ar. Podem ocorrer como saprófitas ou patógenos de plantas, frutas ou vegetais (Pitt *et al.* 2009).



**Figura 10** - Colónias de *Cladosporium cladosporioides* em PDA.

*Cladosporium cladosporioides* (Figura 10) é uma espécie saprófita comum, encontrada frequentemente como contaminante (de Hoog *et al.* 2000) numa larga variedade de alimentos como trigo, farinha, carnes frescas e congeladas e vegetais (Pitt *et al.* 2009). As suas colónias em meio de cultura apresentam coloração verde azeitona com um aspecto aveludado (de Hoog *et al.* 2000; Pitt *et al.* 2009; Bensch *et al.* 2010) e o inverso com uma coloração semelhante (de Hoog *et al.* 2000; Pitt *et al.* 2009). Não apresenta crescimento a temperaturas superiores a 37 °C e tem uma temperatura de crescimento mínima de -5 °C (Pitt *et al.* 2009).

Não lhe são conhecidas micotoxinas (Pitt *et al.* 2009), mas existem casos registados de doenças que lhe são atribuídas, como infecções pulmonares e cutâneas, queratites e um granuloma dentário (de Hoog *et al.* 2000).

### **1.5 - Normas**

Durante a década de 1980, nos EUA, surgiu um grande interesse público em reivindicações feitas pelas indústrias produtoras de plásticos sobre novos produtos amigos do ambiente que diziam ser biodegradáveis. Estas declarações levaram à criação de gabinetes com o intuito de investigar esses novos produtos e as suas capacidades, e concluiu-se com a publicação de um relatório, o “*The Green Report*”, onde se criticava a existência de reivindicações feitas sem qualquer prova científica e onde foram introduzidas ideias como o equilibrar da concorrência através de avaliações e ensaios, que deveriam ser aplicados a todos da indústria (Scott 1999, 2003).

O desenvolvimento de novos materiais e de novas aplicações para materiais existentes deverá estar sujeita a uma avaliação padronizada que seja reconhecida pela indústria específica e pelos países de interesse. Existem múltiplas organizações (Wilde 2005) criadas para lidar com estas situações, tais como a ASTM, a ISO e a VdL, que emitem diversas normas como forma de padronizar a avaliação a que os materiais se devem submeter.

Estas normas são desenvolvidas com diversas problemáticas em mente, como a qualidade, impacto ambiental, segurança, fiabilidade e eficiência [3] e como forma de garantir que os materiais são mais seguros e que estão de acordo com as legislações de saúde, segurança e ambiental [2].

Foi com o intuito de certificar que os seus materiais estavam de acordo com as diferentes normas, que o CFE foi abordado pelo IPN e pelo Grupo de Colóides do Departamento de Química da FCTUC, para que se aplicassem os protocolos mais indicados por algumas daquelas organizações.

### **1.6 - Objectivos**

A popularização do uso de materiais poliméricos na sociedade actual leva a uma necessidade crescente de monitorização das capacidades estruturais e condições de segurança relacionadas com a saúde pública.

Torna-se então imprescindível, pelo impacto económico e ambiental, que estes materiais cumpram as normas aceites (ASTM 1996; ISO 1997; VdL 1998; ASTM 2000) pelas indústrias a que pertencem.

O objectivo deste trabalho foi verificar a resistência de materiais poliméricos e revestimentos à degradação biológica mediada por fungos e a sua resistência face à colonização por microrganismos fúngicos, de forma a corresponderem às normas das suas indústrias.

## **Capítulo II – Materiais e Métodos**



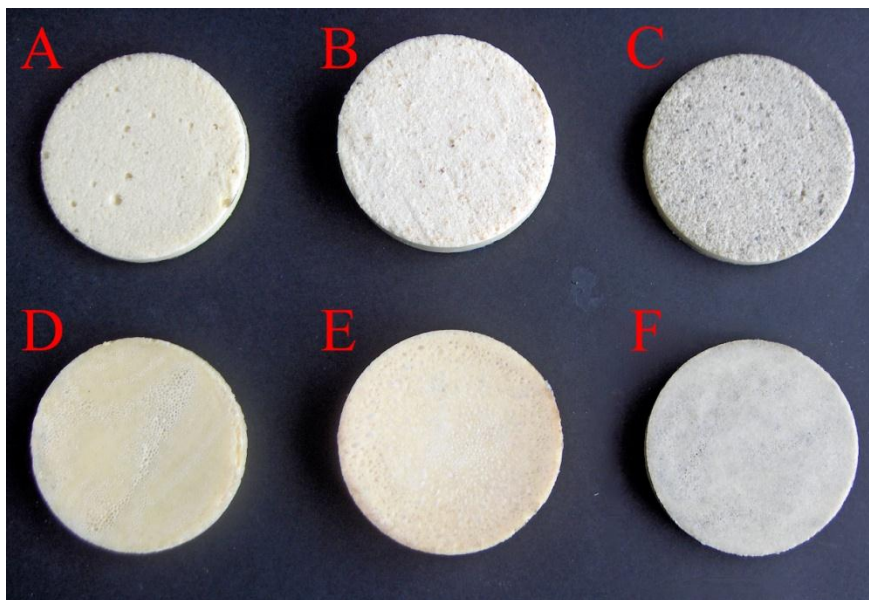
## 2 - Materiais e Métodos

### 2.1 - Material biológico

As espécies fúngicas utilizadas (*Alternaria alternata*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum* e *Cladosporium cladosporioides*) para a realização dos ensaios foram obtidas da biblioteca de fungos do CFE, a partir das quais foram criadas culturas em PDA, mantidas a 30 °C por até quatro meses, sendo estas a origem das culturas utilizadas para a extracção de esporos.

### 2.2 - Material não biológico

Foram utilizadas diversas amostras de PU, todas elas de PE-PU, (Figura 11) para a realização dos ensaios. Estas consistem em PU com *waste*, com e sem uma película protectora (*skin*), PU com madeira, com e sem *skin* e PU com e sem *skin*. Destas amostras, os PUs com *waste* e com madeira são materiais novos desenvolvidos pelo IPN, e os restantes são materiais já utilizados na indústria da construção que serviram como referência ao desempenho dos primeiros. Foi ainda utilizada madeira de bétula (*Betula papyrifera*) como um segundo material de construção como controlo para o PU, na forma de espátulas médicas em embalagens individuais (*Dalian Goodwood Medical Care CHN*).



**Figura 11** - Os diferentes PE-PU's utilizados, **A)** PU sem *skin*; **B)** PU sem *skin* com madeira; **C)** PU sem *skin* com *waste*; **D)** PU com *skin*; **E)** PU com *skin* com madeira; **F)** PU com *skin* com *waste*.

Utilizaram-se ainda amostras de materiais de revestimento (Tabela 3), desenvolvidos pelo Grupo de Colóides do Departamento de Química da FCTUC,

aplicados em pedaços de papel. Estes consistiam num revestimento com o polímero LM 200 e o biocida 8-hidroxiquinolina (A), outro revestimento à base das micropartículas de sílica (Zhao *et al.* 1998) e IPBC adicionado a estas antes do processo de calcinação (B), um outro revestimento também baseado nas micropartículas de sílica (Zhao *et al.* 1998) e IPBC mas este adicionado depois da calcinação (C) e finalmente um outro revestimento (D) baseado numa micropartículas com uma formulação diferente (Santos *et al.* 2011). Para estas amostras foi utilizado papel de filtro *Whatman* número 3, sem revestimentos aplicados, como material de controlo.

**Tabela 3** - Materiais de revestimento utilizados nos ensaios e os seus respectivos componentes.

Revestimentos				
	A	B	C	D
<b>Base</b>	LM 200	Micropartículas de sílica (Zhao <i>et al.</i> 1998)		Micropartículas de sílica (Santos <i>et al.</i> 2011)
<b>Biocida</b>	8-hidroxiquinolina	IPBC		Nenhum
		Antes da calcinação	Depois da calcinação	

O PU foi fornecido cortado em forma de disco, com aproximadamente 6 cm de diâmetro e 1 cm de profundidade, e o papel cortado igualmente em forma de disco com aproximadamente 6 cm de diâmetro. Isto foi de forma a garantir que as amostras cabiam em caixas de Petri com 9 cm de diâmetro.

Todos os discos foram mantidos, separados por tipo, em local fresco, em recipientes fechados e devidamente identificados. As espátulas médicas foram mantidas em local fresco, nos invólucros originais.

## 2.3 - Metodologia

A metodologia empregue foi adaptada a partir de normas aceites pelas indústrias para determinar a resistência a fungos em materiais poliméricos, desenvolvidas pela ASTM (1996, 2000) e ISO (1997), e revestimentos, desenvolvida pela VdL (1998).

### 2.3.1 - Preparação do meio de cultura

O meio de cultura PDA utilizado nas culturas fúngicas foi preparado de acordo com a receita do fabricante, *Difco* EUA, como indicado pela tabela apresentada em baixo (Tabela 4). Os valores indicados são para a preparação de 1 litro de solução. Após a preparação, procedeu-se à esterilização por autoclavagem a 121 °C, à pressão de 1 atm durante 20 minutos. De seguida adicionou-se o antibiótico, estreptomicina a 0,5 mg/ml



(Sigma, EUA) de forma a impedir o crescimento bacteriano. Como os antibióticos, na sua maioria, ficam instáveis a temperaturas demasiado elevadas, este só é adicionado vários minutos após a autoclavagem, para permitir um arrefecimento do meio de cultura.

**Tabela 4** - Componentes utilizados na preparação do meio de cultura PDA.

PDA ( <i>Difco</i> <sup>TM</sup> )	39g
Água destilada	1000 ml

O meio foi posteriormente espalhado em caixas de Petri, de 9 cm de diâmetro, no interior de uma câmara de fluxo laminar, onde ficaram a solidificar. Foram depois embalados e guardados num local fresco e fechado até utilização ulterior.

### **2.3.2 - Extracção de esporos**

As culturas utilizadas para se obterem os esporos tinham todas entre os 7 e os 20 dias de idade.

Cada cultura das diferentes espécies fúngicas foi gentilmente raspada com o auxílio de um bisturi e água destilada para libertar os esporos, que foram depois recolhidos, colocados em suspensão e os recipientes identificados.

Adicionou-se um agente surfactante, o monooleato de sorbitan (Tween-80, Sigma EUA), nunca excedendo os 0,1 g/L, de forma a impedir o agrupamento dos esporos.

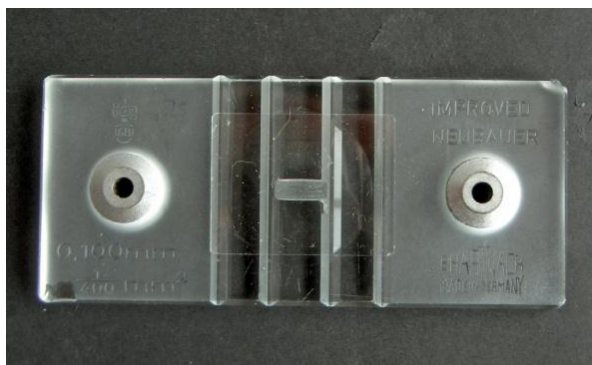
### **2.3.3 - Lavagem de esporos**

A lavagem dos esporos foi realizada de forma a remover os restos do meio de cultura e outras impurezas.

Cada suspensão foi centrifugada a 5.000 rpm durante 1 minuto sendo depois recolhido o sobrenadante e adicionados 10 ml de água destilada para se suspender novamente o *pellet* de esporos. O processo de lavagem foi repetido três vezes por suspensão.

### **2.3.4 - Contagem de esporos**

De forma a ter uma concentração de esporos consistente entre amostras e testes, foi realizada uma contagem de esporos para cada suspensão.



**Figura 12** - Hemocitómetro utilizado para a contagem de esporos.

A contagem foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer ou hemocitómetro (Figura 12) e após determinada a concentração da suspensão foi criada uma nova com a quantidade desejada de  $1.000.000 \pm 200.000$  esporos/ml, a partir da suspensão que foi contada, e o recipiente identificado.

Após finalizadas as suspensões para cada espécie fúngica, foram criadas as suspensões que envolvem mais do que uma espécie, adicionando-se volumes idênticos à mesma concentração das espécies necessárias.

As suspensões podem ser conservadas, a  $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 28 dias, ou até se observar crescimento no recipiente ou o teste de viabilidade falhar.

### **2.3.5 - Preparação do material de teste**

Antes de se procederem aos ensaios foi necessário preparar alguns dos materiais a serem utilizados.

Os discos de PU foram autoclavados a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , à pressão de 1 atm durante 20 minutos e os discos de papel expostos a luz UV durante 10 minutos, de forma a certificar que estavam esterilizados.

As espátulas médicas foram cortadas ao meio, e as duas metades, tal como os discos de PU, foram fixadas às respectivas caixas de Petri recorrendo à aplicação de uma gota de cola na sua base, sempre com o cuidado de posicionar a face com *skin* do PU para cima. Efectuou-se este processo de forma a facilitar a posterior inoculação e observação de resultados.

Para a realização dos ensaios, foram preparados os conjuntos de teste descritos na seguinte tabela (Tabela 5).

**Tabela 5** – Composição dos conjuntos de teste utilizados para a realização dos diversos ensaios.

Conjuntos	1	2	3
Réplicas	4	4	3
Materiais	PDA	PDA	PDA
	Espátula médica	Espátula médica	Papel de filtro <i>Whatman</i> número 3
	PU com <i>skin</i>	PU com <i>skin</i>	Papel com LM 200 e 8-hidroxiquinolina
	PU sem <i>skin</i>	PU sem <i>skin</i>	Papel com micropartículas de sílica (Zhao <i>et al.</i> 1998) e IPBC adicionado antes da calcinação
	PU com <i>skin</i> com <i>waste</i>	PU com <i>skin</i> com madeira	Papel com micropartículas de sílica (Zhao <i>et al.</i> 1998) e IPBC adicionado depois da calcinação
	PU sem <i>skin</i> com <i>waste</i>	PU sem <i>skin</i> com madeira	Papel com micropartículas de sílica (Santos <i>et al.</i> 2011)

### 2.3.6 - Inoculação

Depois de realizada a preparação, as amostras foram inoculadas com 0,5 ml ( $500.000 \pm 100.000$  esporos) da suspensão de esporos composta pelas espécies fúngicas a testar. No caso dos discos de papel, a inoculação foi feita num meio de PDA e os discos de papel foram colocados posteriormente sobre o meio. As caixas de Petri foram então seladas e identificadas com o material, a suspensão utilizada e a data.

O volume de inóculo foi distribuído pela superfície do material ou meio a inocular de forma a cobrir a maior área possível de superfície, através da deposição de pequenas gotas, recorrendo à utilização de uma micropipeta.

### 2.3.7 - Incubação



**Figura 13** - Estufa com material inoculado.

As amostras foram incubadas numa estufa (Figura 13), no escuro, a 30 °C durante 28 dias. Passados 3 a 7 dias eram avaliados os testes de viabilidade dos esporos e conforme o resultado dessa avaliação era decidido se o ensaio era descartado ou não.

No final do período de incubação, as amostras foram avaliadas visualmente de acordo com uma classificação de 5 pontos (Tabela 6), baseada na escala apresentada numa norma da ASTM (1996). Onde são atribuídos valores de acordo com o crescimento observado, 0 se não existir crescimento, 1 se o crescimento for inferior a 10% da superfície, 2 no caso do crescimento abranger entre 10 e 30% da superfície, 3 se estiver entre os 30 e 60% e 4 no caso do crescimento ser superior a 60%.

**Tabela 6** - Classificação do crescimento observado nos materiais (Adaptado de ASTM 1996).

<b>Crescimento observado</b>	<b>Classificação</b>
Nenhum	0
Vestigial (menos de 10%)	1
Ligeiro (10 a 30%)	2
Médio (30 a 60%)	3
Abundante (60 a 100%)	4

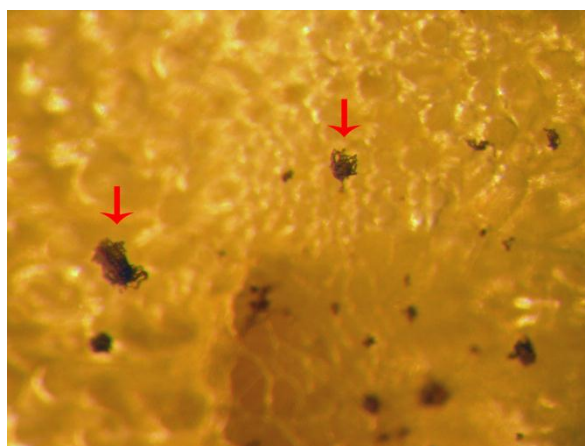
## **Capítulo III – Resultados**



### 3 - Resultados

Todos os ensaios foram avaliados de acordo com uma classificação visual de 5 pontos (Tabela 6), apresentada nos Materiais e Métodos.

Todas as amostras foram avaliadas recorrendo a uma lupa quando o crescimento não era imediatamente aparente a olho nu. Por vezes foram detectados pequenos depósitos de impurezas, tendo-se tido o cuidado extremo de diferenciar impurezas de crescimento fúngico. A título de exemplo, mostra-se um claro caso de crescimento fúngico em PU sem *skin* (Figura 14).



**Figura 14** - Crescimento de *Aspergillus niger* em PU sem *skin* (Lupa 50x).

#### 3.1 - Poliuretano com madeira

Os resultados obtidos em todos os ensaios relativos ao PU com madeira estão apresentados nas seguintes tabelas (Tabelas 7, 8, 9 e 10).

Do que se pode observar, os resultados são muito semelhantes entre si, com o desempenho do PU apresentando-se ao nível do que seria esperado dadas as informações recolhidas sobre o comportamento do material. Nos ensaios só com *Aspergillus nidulans* (Tabela 7) observou-se boa viabilidade de esporos sendo que em todas as réplicas, o crescimento destes cobriu mais de 60% da superfície do PDA. No que toca às espátulas médicas houve uma situação em que não foi possível observar qualquer crescimento, ao passo que nas outras réplicas o crescimento foi vestigial. Quanto ao PU não se registou diferença entre as amostras com *skin* e as amostras sem *skin* e todos os crescimentos observados, no PU com madeira e sem madeira, foram vestigiais. Existindo no entanto uma réplica no PU com *skin* e outra no PU sem *skin* onde não se verificou qualquer crescimento.

**Tabela 7** - Resultados do PU com madeira inoculado com *Aspergillus nidulans*.

<b>Materiais</b>	<b>Réplicas</b>			
	1	2	3	4
PDA	4	4	4	4
Espátula médica	0	1	1	1
PU com <i>skin</i>	0	1	1	1
PU sem <i>skin</i>	1	0	1	1
PU com <i>skin</i> com madeira	1	1	1	1
PU sem <i>skin</i> com madeira	1	1	1	1

Os ensaios com *Aspergillus niger* (Tabela 8) foram bastante uniformes, sendo apenas observados crescimentos vestigiais em todas as réplicas, de quase todos os materiais utilizados. Sendo a exceção as espátulas médicas (Figura 15), onde se registou crescimentos médios e abundantes. O controlo de viabilidade dos esporos apresentou sempre crescimentos abundantes.

**Tabela 8** - Resultados do PU com madeira inoculado com *Aspergillus niger*.

<b>Materiais</b>	<b>Réplicas</b>			
	1	2	3	4
PDA	4	4	4	4
Espátula médica	3	4	4	3
PU com <i>skin</i>	1	1	1	1
PU sem <i>skin</i>	1	1	1	1
PU com <i>skin</i> com madeira	1	1	1	1
PU sem <i>skin</i> com madeira	1	1	1	1

Dos ensaios com *Chaetomium globosum* (Tabela 9), foi registado crescimento quase exclusivamente vestigial, com duas exceções – numa das réplicas de PU com *skin* não se observou crescimento e numa das réplicas das espátulas médicas registou-se crescimento médio. Quanto à viabilidade dos esporos o crescimento foi, em dois casos médio e nos outros dois abundante.

**Tabela 9** - Resultados do PU com madeira inoculado com *Chaetomium globosum*.

<b>Materiais</b>	<b>Réplicas</b>			
	1	2	3	4
PDA	3	4	4	3
Espátula médica	1	1	3	1
PU com <i>skin</i>	1	1	0	1
PU sem <i>skin</i>	1	1	1	1
PU com <i>skin</i> com madeira	1	1	1	1
PU sem <i>skin</i> com madeira	1	1	1	1

Finalmente, no ensaio (Tabela 10) com as três espécies (*A. nidulans*, *A. niger* e *C. globosum*), a viabilidade dos esporos foi positiva, apresentando sempre crescimento



abundante. Tanto nas espátulas médicas como no PU com madeira, com e sem *skin*, só foi registado crescimento vestigial. Ao passo que no PU com *skin* verificaram-se duas situações em que não houve crescimento e no PU sem *skin* ocorreu uma situação igual, todas as outras réplicas destes dois materiais apresentaram crescimento vestigial.

**Tabela 10** - Resultados do PU com madeira inoculado com *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Chaetomium globosum*.

Materiais	Réplicas			
	1	2	3	4
PDA	4	4	4	4
Espátula médica	1	1	1	1
PU com <i>skin</i>	1	0	1	0
PU sem <i>skin</i>	0	1	1	1
PU com <i>skin</i> com madeira	1	1	1	1
PU sem <i>skin</i> com madeira	1	1	1	1

Duas situações que são de realçar são os resultados das espátulas médicas inoculadas com *A. niger* (Figura 15, Tabela 8) que apresentaram crescimento médio ou abundante e um resultado com crescimento médio numa das réplicas da inoculação do mesmo material com *C. globosum* (Tabela 9, réplica 3).



**Figura 15** - Espátula médica dos ensaios do PU com madeira inoculada com *Aspergillus niger*.

### 3.2 - Poliuretano com *waste*

As tabelas apresentadas em seguida, são referentes aos resultados dos ensaios feitos com o PU com *waste* (Tabelas 11, 12, 13 e 14).

Nos ensaios de PU com *waste* os testes de viabilidade dos esporos de *A. nidulans* (Tabela 11) apresentaram sempre crescimentos abundantes. As espátulas médicas apresentaram duas réplicas em que não houve crescimento e duas em que o crescimento

foi vestigial. No PU com e sem *skin* não se verificaram grandes diferenças entre eles, sendo que de todas as réplicas apenas uma, de PU com *skin*, não apresentou crescimento e todas as outras tinham crescimento vestigial. Quanto ao PU com *waste*, duas das réplicas com *skin* tiveram crescimento vestigial e as outras duas não tiveram crescimento, enquanto que das réplicas sem *skin*, apenas uma teve crescimento vestigial e as outras três não apresentaram qualquer crescimento.

**Tabela 11** - Resultados do PU com *waste* inoculado com *Aspergillus nidulans*.

<b>Materiais</b>	<b>Réplicas</b>			
	1	2	3	4
PDA	4	4	4	4
Espátula médica	1	0	0	1
PU com <i>skin</i>	0	1	1	1
PU sem <i>skin</i>	1	1	1	1
PU com <i>skin</i> com <i>waste</i>	1	1	0	0
PU sem <i>skin</i> com <i>waste</i>	0	1	0	0

Os ensaios com *A. niger* em PU com *waste* (Tabela 12) registaram crescimento vestigial tanto nas espátulas médicas como no PU com e sem *skin*. No PU com *waste* e com *skin* uma das réplicas não apresentou crescimento e as outras três apresentaram crescimento vestigial, enquanto que no PU com *waste* e sem *skin* registou-se três réplicas sem crescimento e uma com crescimento vestigial. No que toca à viabilidade dos esporos, o crescimento foi sempre abundante.

**Tabela 12** - Resultados do PU com *waste* inoculado com *Aspergillus niger*.

<b>Materiais</b>	<b>Réplicas</b>			
	1	2	3	4
PDA	4	4	4	4
Espátula médica	1	1	1	1
PU com <i>skin</i>	1	1	1	1
PU sem <i>skin</i>	1	1	1	1
PU com <i>skin</i> com <i>waste</i>	1	0	1	1
PU sem <i>skin</i> com <i>waste</i>	0	0	1	0

Os resultados dos ensaios com *C. globosum* foram muito uniformes (Tabela 13). Todos os materiais apresentaram crescimento vestigial, enquanto que a viabilidade dos esporos apresentou crescimento abundante.

**Tabela 13** - Resultados do PU com *waste* inoculado com *Chaetomium globosum*.

<b>Materiais</b>	<b>Réplicas</b>			
	1	2	3	4
PDA	4	4	4	4
Espátula médica	1	1	1	1
PU com <i>skin</i>	1	1	1	1
PU sem <i>skin</i>	1	1	1	1
PU com <i>skin</i> com <i>waste</i>	1	1	1	1
PU sem <i>skin</i> com <i>waste</i>	1	1	1	1

Nos ensaios (Tabela 14) com as três espécies (*A. nidulans*, *A. niger* e *C. globosum*), a viabilidade dos esporos ficou comprovada com todas as réplicas a apresentarem crescimento abundante. Nas espátulas médicas registaram-se duas réplicas com crescimento vestigial e duas sem qualquer crescimento. As amostras de PU com *skin* registaram uma réplica com crescimento vestigial e as restantes sem crescimento, ao passo que no PU sem *skin*, só uma réplica não apresentou crescimento enquanto que as outras três tiveram crescimento vestigial. No PU com *waste*, as amostras com *skin* apresentaram uma réplica sem crescimento e três com crescimento vestigial, no entanto no PU com *waste* e sem *skin* não se observou crescimento em nenhuma das réplicas.

**Tabela 14** - Resultados do PU com *waste* inoculado com *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Chaetomium globosum*.

<b>Materiais</b>	<b>Réplicas</b>			
	1	2	3	4
PDA	4	4	4	4
Espátula médica	1	1	0	0
PU com <i>skin</i>	0	1	0	0
PU sem <i>skin</i>	1	1	0	1
PU com <i>skin</i> com <i>waste</i>	1	0	1	1
PU sem <i>skin</i> com <i>waste</i>	0	0	0	0

É de realçar o elevado número de réplicas, nos diversos ensaios, em que não foi possível observar qualquer tipo de crescimento fúngico no PU com *waste*, com maior predominância, para os que não apresentavam *skin*.

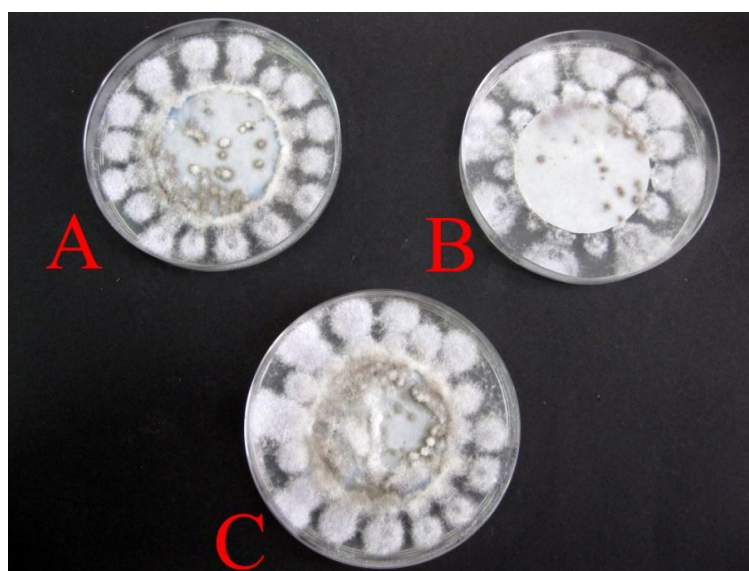
### 3.3 - Revestimento

Os resultados dos revestimentos estão apresentados nas tabelas seguintes (Tabelas 15 e 16).

**Tabela 15** - Resultados do revestimento inoculado com *Alternaria alternata* e *Cladosporium cladosporioides*, respeitantes à superfície total da caixa de Petri.

Materiais	Réplicas		
	1	2	3
PDA	4	4	4
Papel	4	4	4
Papel LM 200 e 8-hidroxiquinolina	3	2	3
Papel com micropartículas de sílica (Zhao <i>et al.</i> 1998) e IPBC adicionado antes da calcinação	4	4	4
Papel com micropartículas de sílica (Zhao <i>et al.</i> 1998) e IPBC adicionado depois da calcinação	3	3	2
Papel com micropartículas de sílica (Santos <i>et al.</i> 2011)	3	4	4

Convém referir que a avaliação realizada neste caso (Tabela 15) é referente ao crescimento observado na superfície total das caixas de Petri, incluindo a superfície dos discos de papel. Sendo que se tratam de materiais de revestimento, um ajuste no método de avaliação de forma a que seja referente apenas à superfície dos discos de papel, torna possível analisar melhor a eficácia das diferentes formulações testadas. Isto será melhor compreendido através da observação dos resultados dos discos de papel com micropartículas de sílica (Zhao *et al.* 1998) e IPBC adicionado depois da calcinação (Figura 16), em que duas das réplicas (1 e 3) apresentavam superfícies de papel com crescimento fúngico reduzido.



**Figura 16** - Discos de papel com micropartículas de sílica (Zhao *et al.* 1998) e IPBC adicionado depois da calcinação, inoculados com *Alternaria alternata* e *Cladosporium cladosporioides*, A) réplica 1; B) réplica 3; C) réplica 2.

Julgando pelos resultados ajustados (Tabela 16), no caso da utilização das micropartículas de sílica, a formulação com IPBC adicionado depois da calcinação apresentou uma eficácia elevada quando comparado com as outras formulações. Nessa

amostra registou-se uma réplica com crescimento vestigial, uma com crescimento ligeiro e outra com crescimento médio, enquanto que as amostras com IPBC adicionado antes da calcinação e as que eram só compostas por micropartículas de sílica apresentaram crescimento abundante em todas as réplicas.

No caso das amostras com biocida é possível verificar uma inibição de crescimento bastante acentuada na superfície do papel (Tabela 16), sendo que os principais focos de crescimento registados nessas caixas ocorreram no PDA em redor desse, juntamente com alguns vestígios na superfície tratada.

**Tabela 16** - Resultados ajustados do revestimento, considerando apenas a superfície do papel, inoculado com *Alternaria alternata* e *Cladosporium cladosporioides*. (NA – Não Aplicável).

Materiais	Réplicas		
	1	2	3
PDA	NA	NA	NA
Papel	4	4	4
Papel com LM 200 e 8-hidroxiquinolina	1	1	1
Papel com micropartículas de sílica (Zhao <i>et al.</i> 1998) e IPBC adicionado antes da calcinação	4	4	4
Papel com micropartículas de sílica (Zhao <i>et al.</i> 1998) e IPBC adicionado depois da calcinação	2	3	1
Papel com micropartículas de sílica (Santos <i>et al.</i> 2011)	4	4	4



## **Capítulo IV – Discussão**





#### 4 - Discussão

Os resultados obtidos não indiciam susceptibilidade à degradação por parte dos polímeros testados, dado que os crescimentos observados nos materiais à base de PE-PU podem ser todos considerados vestigiais, não pondo em risco a integridade e características dos materiais. Pode-se portanto, considerar que a adição dos desperdícios de construção civil ou da madeira reciclada como material de estabilização dos compostos não veio prejudicar o comportamento já conhecido do PE-PU (Darby *et al.* 1968; Nakajima-Kambe *et al.* 1999; Shah *et al.* 2008). É ainda possível observar que a adição de uma *skin* aos materiais não causa diferenças significativas no crescimento fúngico observado.

As duas situações realçadas dos ensaios com o PU com madeira em que se observou crescimento médio ou abundante de *Aspergillus niger* (Tabela 8) e de *Chaetomium globosum* (Tabela 9) nas espátulas médicas podem ter ocorrido devido a uma de várias situações – como pelo facto das espécies em questão serem capazes de decompor celulose (Smith 1977; Pitt *et al.* 2009; Bennett 2012), ou devido ao resultado de uma contaminação que potenciase o crescimento das espécies, ou de uma falha no processamento a que as espátulas médicas são submetidas durante o processo de fabrico. O facto deste comportamento apenas ter sido observado nestas duas situações aponta mais para uma contaminação ou uma falha no processamento do material.

Caso o processo de produção destes dois materiais seja vantajoso de um ponto de vista económico, poderá ser de particular interesse seguir com a industrialização do mesmo. De realçar ainda que estes reutilizam materiais que iriam para as lixeiras, tentando diminuir dessa maneira o impacto da produção de um produto resistente à degradação fúngica e consequentemente à biodegradação. Materiais como estes são ainda de particular interesse para a produção de equipamento hospitalar ou de vaivéns espaciais, dado que ajudam a resolver a problemática da exposição prolongada a possíveis contaminantes prejudiciais para a saúde, como é destacado por alguns autores (Ilyin 2005; Savelyev *et al.* 2009).

Os resultados obtidos dos ensaios com os revestimentos revelam uma eficácia elevada na prevenção do crescimento fúngico por parte do LM 200 quando combinado com 8-hidroxiquinolina. No entanto, o mesmo não pode ser dito relativamente aos outros tratamentos. Comparando as amostras com micropartículas de sílica (Zhao *et al.* 1998) e IPBC, é fácil verificar que o IPBC perde eficácia quando é adicionado às

micropartículas antes destas serem calcinadas, e que apresenta uma eficácia próxima daquela exibida pelo LM 200 e 8-hidroxiquinolina quando aplicado às micropartículas de sílica após a calcinação. No entanto pode-se constatar algumas variações nos resultados entre réplicas. Esta variação nos resultados do papel com micropartículas e IPBC adicionado após a calcinação aponta ou para uma menor eficácia do IPBC como biocida para *Alternaria alternata* e *Cladosporium cladosporioides*, quando as espécies são inoculadas em simultâneo, ou para uma falha no controlo da libertação do biocida pelas micropartículas. Finalmente, quanto ao desempenho das segundas micropartículas de sílica (Santos *et al.* 2011) é bastante claro que esta formulação não tem potencial como agente biocida.

A utilização de formulações que incorporem agentes biocidas fúngicos em conjugação com tintas, adiciona um grau extra de protecção no que diz respeito à degradação e corrosão de materiais. A presença de biocidas vai prevenir contra ataques fúngicos, garantindo um menor nível de degradação e uma diminuição de potenciais riscos de saúde por reduzir a exposição a espécies fúngicas potencialmente patogénicas. Acções deste tipo têm impacto na diminuição dos custos associados com a reparação e substituição de materiais danificados, e ainda em despesas de saúde.

A realização dos diversos ensaios recorrendo a uma utilização de espécies individuais e à sua combinação, permite uma comparação de resultados e torna possível a repetição dos ensaios aqui realizados, de uma forma facilitada, para o mesmo tipo de polímeros e revestimentos, ou eventualmente outros semelhantes.

O uso de espécies isoladas e das suas combinações possibilita inferir sobre o impacto da competição interespecífica que pode existir, como reportado por Domsch *et al.* (2007). No entanto, isso não foi aqui notado, ou por não haver crescimento ou por este não ter sido afectado.

## **Capítulo V – Conclusão e Perspectivas**



## 5 - Conclusão e Perspectivas

O trabalho aqui apresentado advém da capacidade do CFE em contribuir com respostas para questões de teor mais prático colocadas por parte das indústrias.

Este estudo permitiu validar a resistência à biocontaminação por microfungos nos materiais à base de PE-PU. Os resultados aqui obtidos confirmam a resistência à degradação fúngica do PE-PU, como já demonstrado por outros autores (Darby *et al.* 1968; Nakajima-Kambe *et al.* 1999), e permitem inferir que a adição da madeira e do *waste* não altera a resistência já demonstrada.

Com os resultados dos revestimentos fica bastante claro que a combinação de LM 200 com 8-hidroxiquinolina é bastante eficaz em prevenir o crescimento fúngico nas superfícies em que é aplicado, e que as micropartículas de sílica em conjunto com o IPBC adicionado após a calcinação, apresentam algum potencial para a prevenção de biocontaminações.

Uma hipótese a considerar seria a realização do mesmo ensaio substituindo o IPBC por outros biocidas. A utilização de outros biocidas adicionados às micropartículas de sílica pode acabar por revelar uma combinação que seja mais eficaz e que, juntamente com a combinação LM 200 e 8-hidroxiquinolina, ajude ao aparecimento de novos produtos de revestimento com maior potencial para controlar os agentes de degradação. Convém, no entanto, ter em conta que é necessário escolher biocidas que não sejam prejudiciais à saúde de outras espécies de forma a evitar afectar negativamente os ecossistemas onde estes produtos fossem ser utilizados.

Como já enfatizado por Savelyev *et al.* (2009) esquemas tecnológicos para a protecção humana contra ataques por microrganismos deveriam ser elaborados. Materiais como estes aqui testados poderiam fazer parte de considerações a tomar numa situação em que um destes conceitos surgisse. Infelizmente para uma abordagem destas é necessária a contribuição de vários ramos de especialistas em materiais e saúde, o que torna difícil a criação de tal movimento.

No entanto, a necessidade constante de elaboração e actualização de normas de qualidade faz com que uma área como a micologia, pela variedade, abundância de espécies de fungos e importância médica, seja essencial para esse mesmo desenvolvimento.



## **Capítulo VI – Referências Bibliográficas**





## **6 - Referências Bibliográficas**

### **6.1 - Artigos e Livros**

- ASTM (1996) Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi. American Society for Testing and Materials. G 21 - 96 (Reapproved 2002).
- ASTM (2000) Standard Test Method for Determining Fungi Resistance of Insulation Materials and Facings. American Society for Testing and Materials. C 1338 - 00.
- Bennett JW (2012) An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: Machida M, Gomi K (ed) *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, 1st edn. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 1-17.
- Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell BA, Shin HD, Dugan FM, Schroers HJ, Braun U, Crous PW (2010) Species biodiversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Stud Mycol.* 67:1-94.
- Biron M (2007) *Thermoplastics and Thermoplastic Composites: Technical Information for Plastics Users*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Bush RK, Portnoy JM, Saxon A, Terr AI, Wood RA (2006) The medical effects of mold exposure. *J Allergy Clin Immunol.* 117:326-333.
- Chandra R, Rustgi R (1998) Biodegradable polymers. *Prog Polym Sci.* 23:1273-1335.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS (2007) Fungal Communities Associated with Degradation of Polyester Polyurethane in Soil. *Appl Environ Microbiol.* 73:5817-5824.
- Darby RT, Kaplan AM (1968) Fungal Susceptibility of Polyurethanes. *Appl Microbiol.* 16:900-905.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2000) *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Domsch KH, Gams W, Anderson T-H (2007) *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London.
- Gu J-D (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int Biodeterior Biodegrad.* 52:69-91.

- Gu J-D (2007) Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 59:170-179.
- Howard GT (2002) Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 49:245-252.
- Hyvärinen A, Meklin T, Vepsäläinen A, Nevalainen A (2002) Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials - concentrations and diversity. *Int Biodeterior Biodegrad.* 49:27-37.
- Ilyin VK (2005) Microbiological status of cosmonauts during orbital spaceflights on Salyut and Mir orbital stations. *Acta Astronaut.* 56:839-850.
- ISO (1997) Plastics - Evaluation of the action of microorganisms. International Organization for Standardization. ISO 846:1997(E).
- Klintworth R, Reher HJ, Viktorov AN, Bohle D (1999) Biological induced corrosion of materials II: new test methods and experiences from Mir station. *Acta Astronaut.* 44:569-578.
- Kozakiewicz Z (1995) *Emericella nidulans*. *IMI Descr Fungi Bact.* 1254:1-2.
- Loredo-Treviño A, Gutiérrez-Sánchez G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN (2012) Microbial Enzymes Involved in Polyurethane Biodegradation: A Review. *J Polym Environ.* 20:258-265.
- Lugauskas A, Levinskaitė L, Pečiulytė D (2003) Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *Int Biodeterior Biodegrad.* 52:233-242.
- Maillard J-Y (2004) Antifungal activity of disinfectants - Antifungal activity of biocides. In: Fraiese AP, Lambert PA, Maillard J-Y (ed) *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*, 4th edn. Blackwell Publishing Ltd, Norfolk, pp. 205-219.
- Matsushima T (1975) *Icones Microfungorum a Matsushima lectorum*. T. Matsushima, Kobe.
- McDonnell G, Russell AD (1999) Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 12:147-179.

- Mohan SK, Srivastava T (2010) Microbial deterioration and degradation of polymeric materials. *J Biochem Tech.* 2:210-215.
- Moore SL, Payne DN (2004) Types of antimicrobial agents. In: Fraise AP, Lambert PA, Maillard J-Y (ed) Russel, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization, 4th edn. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 8-97.
- Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T (1999) Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51:134-140.
- Nielsen KF (2003) Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol.* 39:103-117.
- Onions AHS (1966a) *Aspergillus niger*. CMI Descr Pathog Fungi Bact. 94:1-2.
- Onions AHS (1966b) *Emmericella nidulans*. CMI Descr Pathog Fungi Bact. 93:1-2.
- Park D, Wang J, Klibanov AM (2006) One-Step, Painting-Like Coating Procedures To Make Surfaces Highly and Permanently Bactericidal. *Biotechnol Prog.* 22:584-589.
- Phillips JP (1956) The Reactions Of 8-Quinolinol. *Chem Rev.* 56:271-297.
- Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York.
- Raper KB, Fennell DI (1965) *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1999) *Biology of Plants*. W.H. Freeman and Company / Worth Publishers, New York.
- Russell AD (2004) Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: Fraise AP, Lambert PA, Maillard J-Y (ed) Russel, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization, 4th edn. Blackwell Publishing Ltd, Norfolk, pp. 98-127.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC (2004) *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Santos Sd, Lundberg D, Piculell L (2011) Responsive and evolving mixtures of a hydrolyzing cationic surfactant and oppositely charged polyelectrolytes. *Soft Matter.* 7:5540-5544.

- Savelyev Y, Rudenko A, Robota L, Koval E, Savelyeva O, Markovskaya L, Veselov V (2009) Novel polymer materials for protecting crew and structural elements of orbital station against microorganisms attack throughout long-term operation. *Acta Astronaut.* 64:36-40.
- Scott G (1999) *Polymers and the Environment*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Scott G (2003) Science and Standards. In: Chiellini E, Solaro R (ed) *Biodegradable Polymers and Plastics*, 1st edn. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp. 3-32.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008) Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol Adv.* 26:246-265.
- Shimao M (2001) Biodegradation of plastics. *Curr Opin Biotechnol.* 12:242-247.
- Simmons EG (2007) *Alternaria: an identification manual*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Singh B, Sharma N (2008) Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym Degrad Stab.* 93:561-584.
- Smith RE (1977) Rapid Tube Test for Detecting Fungal Cellulase Production. *Appl Environ Microbiol.* 33:980-981.
- Sørensen G, Nielsen AL, Pedersen MM, Poulsen S, Nissen H, Poulsen M, Nygaard SD (2010) Controlled release of biocide from silica microparticles in wood paint. *Prog Org Coat.* 68:299-306.
- Thomma BPHJ (2003) *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol Plant Pathol.* 4:225-236.
- Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Aiba S (2009) Biodegradability of Plastics. *Int J Mol Sci.* 10:3722-3742.
- VdL (1998) Richtlinie zur Bestimmung der Beständigkeit von Beschichtungsstoffen gegen Pilzbefall. Verband der Lackindustrie e.V. VdL-RL 06.
- Watanabe T (2002) *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultural Fungi and Key to Species*. CRC Press, Boca Raton.

Wilde BD (2005) International and National Norms on Biodegradability and Certification Procedures. In: Bastioli C (ed) Handbook of Biodegradable Polymers, 1st edn. Rapra Technology Limited, Shropshire, pp. 145-181.

Zee Mvd (2005) Biodegradability of Polymers - Mechanisms and Evaluation Methods. In: Bastioli C (ed) Handbook of Biodegradable Polymers, 1st edn. Rapra Technology Limited, Shropshire, pp. 1-31.

Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD (1998) Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. Science. 279:584-552.

## 6.2 - Referências online

[1] - ChemicalBook, Iodopropynyl butylcarbamate. Disponível em: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6334602.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6334602.htm) (Acedido em 18 de Junho de 2012).

[2] - ISO, Discover ISO – What standards do. Disponível em: [http://www.iso.org/iso/about/discover-iso\\_what-standards-do.htm](http://www.iso.org/iso/about/discover-iso_what-standards-do.htm) (Acedido em 4 de Junho de 2012).

[3] - ISO, Discover ISO – Why standards matter. Disponível em: [http://www.iso.org/iso/about/discover-iso\\_why-standards-matter.htm](http://www.iso.org/iso/about/discover-iso_why-standards-matter.htm) (Acedido em 4 de Junho de 2012).

[4] - MycoBank, Alternaria alternata. Disponível em: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=900&Field=s=All> (Acedido em 19 de Junho de 2012).

[5] - MycoBank, Aspergillus niger. Disponível em: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=2506&Fields=All> (Acedido em 21 de Junho de 2012).

[6] - MycoBank, Emericella nidulans. Disponível em: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=46553&Fields=All> (Acedido em 21 de Junho de 2012).

[7] - The World Corrosion Organization, Now is the Time. Disponível em: [http://www.corrosion.org/images\\_index/nowisthetime.pdf](http://www.corrosion.org/images_index/nowisthetime.pdf) (Acedido em 14 de Junho de 2012).

[8] - Wikipedia, 8-Hydroxyquinoline. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/8-Hydroxyquinoline> (Acedido em 14 de Junho de 2012).

- [9] - Wikipedia, Aflatoxin. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Aflatoxin> (Acedido em 21 de Junho de 2012).
- [10] - Wikipedia, Coating. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Coating> (Acedido em 14 de Junho de 2012).
- [11] - Wikipedia, Fumagillin. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fumagillin> (Acedido em 21 de Junho de 2012).
- [12] - Wikipedia, Ochratoxin A. Disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/Ochratoxin\\_A](http://en.wikipedia.org/wiki/Ochratoxin_A) (Acedido em 21 de Junho de 2012).
- [13] - Wikipedia, Plastic. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Plastic> (Acedido em 20 de Junho de 2012).

### **6.3 - Referências online de imagens**

- [14] - [http://en.wikipedia.org/wiki/File:8-idrossichinolina\\_struttura.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:8-idrossichinolina_struttura.svg) (Acedido em 14 de Junho de 2012).
- [15] - <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Ipbc.svg> (Acedido em 14 de Junho de 2012).
- [16] - [http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/a/Alternaria\\_alternata\\_colony-1.htm](http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/a/Alternaria_alternata_colony-1.htm) (Acedido em 20 de Junho de 2012).